

Chemiluminescence determination of biosubstances by flow injection analysis

| | |
|------|---|
| 著者 | Hasebe Takashi |
| 内容記述 | Thesis (Ph.D. in Science)--University of Tsukuba, (A), no. 1676, 1997.3.24 |
| 発行年 | 1997 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/5888 |

| | | |
|-----------|--|------------------|
| 氏 名(本 籍) | は せ べ 長谷部 | たかし 隆 (茨 城 県) |
| 学 位 の 種 類 | 博 士 (理 学) | |
| 学 位 記 番 号 | 博 甲 第 1,676 号 | |
| 学位授与年月日 | 平 成 9 年 3 月 24 日 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当 | |
| 審 査 研 究 科 | 化 学 研 究 科 | |
| 学位論文題目 | Chemiluminescence Determination of Biosubstances by Flow Injection Analysis (フローインジェクション分析法による生体成分の化学発光定量法) | |
| 主 査 | 筑波大学教授 | 理学博士 河 鳶 拓 治 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | 理学博士 岡 本 健 一 |
| 副 査 | 筑波大学教授 | Ph. D. 下 山 晃 |
| 副 査 | 筑波大学助教授 | Ph. D. 山 本 泰 彦 |

論 文 の 内 容 の 要 旨

化学発光反応は、物質の化学変化に伴って生成した励起分子が基底状態に戻る時に、光が放出される過程と共存する蛍光物質に励起分子からエネルギー移動が起こり、蛍光を発する過程などが含まれる。これらの発光反応は金属イオンや過酸化水素などの酸化剤によって促進されるので、微量金属イオンや過酸化水素の定量を行うことができる。また酵素反応により生成する過酸化水素を化学発光により定量することで生体成分の定量が可能となる。本論文ではルシゲニン (*N, N'*-ジメチル9,9'-ビアクリジニウム)、ビス (2,4,6-トリクロロフェニル) オキザレート (TCPO) およびルミノールによる化学発光と連続流れ分析法であるフローインジェクション分析法 (FIA) を組み合わせて各種生体成分の迅速簡便かつ高感度な新しい分析法を開発し、それらの成果をまとめている。

本論文は 6 章からなる。第 1 章序論では、化学発光反応に基づいた金属イオン、生体基質測定への応用例および FIA の有用性を述べ、本研究の内容を概説している。第 2 章では、化学発光反応に及ぼす諸因子について考察している。化学発光の量子収率および被定量物質と化学発光試薬との反応の速度を向上させれば、高感度な定量が可能となり、量子収率の向上にはミセルを形成する分子集合体が、反応速度の向上には金属イオンに代表される触媒が有効であることを述べている。第 3 章ではルシゲニンが、通常の化学発光試薬とは異なって酸化剤のみならず還元性試薬によっても発光するという特徴に着目し、アスコルビン酸の微量分析法を開発した。ルシゲニンの反応生成物 (発光種) である *N*-メチルアクリドンが水に難溶性であるため、測定システムの汚染が問題となるという難点があったが、非イオン性界面活性剤である Brij35 を可溶化剤かつ増感剤として用いることで解決し、FIA に応用している。また、金属イオンとして Fe (III) が著しい増感効果を示すことを見出し、界面活性剤 Fe (III) との組合せにより約 100 倍の増感効果を得て、検出限界 ($S/N=3$) 2×10^{-9} M のアスコルビン酸の検出を可能とし、実試料への応用を試みている。第 4 章では、O/W エマルジョン系中でのエネルギー受容体ベリレン共存下における TCPO の化学発光を利用する過酸化水素の FIA を開発している。これまで TCPO は水に難溶かつ不安定であるため有機溶媒過剰の条件下でのみ測定が行われてきたが、界面活性剤を乳化剤として用いる O/W エマルジョン中では TCPO の半減期は 4.5 時間と大幅に安定性の向上をはかった。過酸化水素の検出限界 ($S/N=3$) は 1×10^{-7} M であった。また、固定化したグルタミン酸オキシダーゼを充填したカラムをフローシステム中に導入することによりグルタミン酸の分析を可能にしている。第 5 章では、コバルト (II) をルミノール

ル化学発光の触媒として用い、陰イオン性界面活性剤ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を増感剤として用いることにより、超高感度な 1) 過酸化水素の分析法を開発し、各種酵素反応と組み合わせることにより 2) グルタミン酸およびグルタミンの同時定量、3) アセチルコリンの定量、4) コリンの定量、5) アセチルコリンおよびコリンの同時定量に応用している。2) で FIA システム中の試料注入バルブより注入された試料を 2 流路に分割して送液し、一方の流路ではグルタミン酸 (pI 3.22) とグルタミン (pI 5.65) の等電点に着目し、陰イオン交換カラムによりグルタミン酸のみを樹脂に吸着させ、グルタミンのみを流出させる。この溶液がさらにグルタミナーゼおよびグルタミン酸オキシダーゼのカラムを通過しグルタミンに由来する過酸化水素の第 1 ピークを得ている。また、他方の流路では、試料は遅延コイルを通過しグルタミン酸のみがグルタミン酸オキシダーゼカラム内で過酸化水素に変換され第 2 ピークとして検出される。この方法では 10^{-7} M オーダーのグルタミン酸及びグルタミンの同時定量を可能とし、細胞培養用培地中のグルタミン酸及びグルタミンの定量に応用している。3) ではアセチルコリンエステラーゼ、コリンオキシダーゼの作用によりアセチルコリンを過酸化水素に変換し、この過酸化水素を 1) の定量法により定量するものであり、共存するコリンに由来する過酸化水素はカタラーゼカラム内で分解することにより除去している。またアルブミンに代表される共存タンパク質およびアスコルビン酸、尿酸などの共存物質の影響は、それぞれ限外ろ過膜を分離膜とする透析装置および陰イオン交換カラムをフローシステム中に導入することにより除去し、前処理を行わないで測定を可能としている。この方法では、 10^{-7} M オーダーのアセチルコリンを 1 時間に 15 検体の測定が可能であった。4) ではコリンオキシダーゼカラムのみを用いてコリンのみの定量を、5) では 3) および 4) で用いたフローシステムでコリンオキシダーゼカラムの下流に遅延コイルを導入し流路を二つに分離し、一方の流路ではアセチルコリンのみに由来する過酸化水素の第 1 ピークを得、他方の遅延コイルの流路ではコリンのみに由来する過酸化水素の第 2 ピークとして検出するものである。この同時定量法を細胞培養用培地中のアセチルコリンおよびコリンの定量に応用している。第 6 章では全体を総括し、結論を述べている。

審 査 の 結 果 の 要 旨

化学発光反応を利用する分析法は、高感度な定量が可能となることから利用価値が高いが、著者は化学発光反応場として界面活性剤からなる分子集合体を用いることで、より高感度な分析法の開発を行った。特にエマルジョンを化学発光の場として利用する報告例は少なく、極めて斬新な方法であり、この系を FIA に適用し定量を確立したことは高く評価できる。また酵素反応と組み合わせて生体成分の新しい定量法及び同時定量法に発展させたことは、この分野における大きな貢献であり、著者が研究者としての十分な資質を有することを示すものである。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。